

24. 3. 2004

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

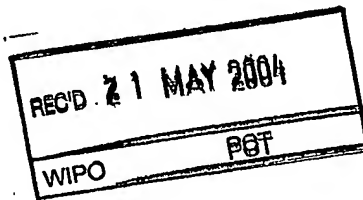
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日      2 0 0 3 年    3 月 2 4 日  
Date of Application:

出 願 番 号      特 願 2 0 0 3 - 0 8 1 1 4 8  
Application Number:  
[ST. 10/C]:      [ J P 2 0 0 3 - 0 8 1 1 4 8 ]

出 願 人      持 立   克 身  
Applicant(s):      独 立 行 政 法 人 国 立 環 境 研 究 所

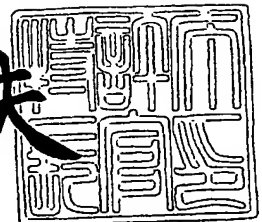


**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年    4 月 2 8 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 2003P1549

【提出日】 平成15年 3月24日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 5/00

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市竹園 3-108-404

    【氏名】 持立 克身

【特許出願人】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市竹園 3-108-404

    【氏名又は名称】 持立 克身

【代理人】

    【識別番号】 100107984

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 廣田 雅紀

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 044347

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 細胞培養基質

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 分子内に疎水性を有する直鎖状骨格と蛋白質またはペプチドと反応しうる官能基とを有している疎水結合性吸着ポリマーでコーティングされていることを特徴とする細胞培養基質。

【請求項 2】 細胞培養基質の基材が、生物性ポリマー、プラスチック、天然または合成ゴム、無機物または金属からなる請求項 1 記載の細胞培養基質。

【請求項 3】 生物製ポリマーが、コラーゲン、ゼラチン、セルロースまたはポリ乳酸である請求項 2 記載の細胞培養基質。

【請求項 4】 プラスチックが、熱可塑性樹脂または熱硬化性樹脂である請求項 2 記載の細胞培養基質。

【請求項 5】 熱可塑性樹脂が、アクリル樹脂、ポリ塩化ビニル樹脂、ポリエチレン樹脂、ポリスチレン樹脂、ポリプロピレン樹脂、ポリメチルペンテン樹脂またはフッ素樹脂である請求項 4 記載の細胞培養基質。

【請求項 6】 熱硬化性樹脂が、フェノール樹脂、尿素樹脂、エポキシ樹脂、メラミン樹脂またはシリコン樹脂である請求項 4 記載の細胞培養基質。

【請求項 7】 合成ゴムが、ブタジエンスチレンゴム、ブタジエンアクリロニトリルゴム、ブチルゴム、多硫化系合成ゴム、フッ素ゴムまたはシリコンゴムである請求項 2 記載の細胞培養基質。

【請求項 8】 無機物が、ガラス、ヒドロキシアパタイト、IC 基材またはカーボンナノチューブである請求項 2 記載の細胞培養基質。

【請求項 9】 金属が、不活性 (i n e r t) な金、白金、チタンあるいはこれらの酸化物である請求項 2 記載の細胞培養基質。

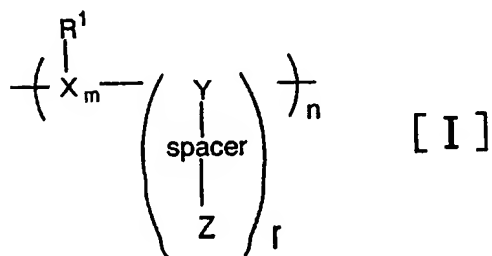
【請求項 10】 請求項 2 ～ 9 記載の基材からなる細胞培養基質が、培養皿 (ウェル)、プリント配線板または人工臓器である請求項 1 ～ 9 記載の細胞培養基質。

【請求項 11】 人工臓器が、人工血管、人工心肺または人工腎臓である請求項 10 記載の細胞培養基質。

【請求項 12】 細胞培養基質が、シリコンゴムを基材とした培養皿（ウェル）である請求項 1 または 10 記載の細胞培養基質。

【請求項 13】 疎水結合性吸着ポリマーが、以下の一般式 [I] で表される請求項 1～12 記載の細胞培養基質。

【化 1】



（式中、XはCHまたはNHCHCOを示し、YはCHまたはNCR<sup>2</sup>COを示し、R<sup>1</sup>はH、炭素数1～3のアルキル基、炭素数1～3のアルコキシ基、炭素数6～8のアリールまたはアラアルキル基または炭素数6～8のアリールオキシまたはアラアルキルオキシ基を示し、R<sup>2</sup>はHまたは炭素数1～3のアルキル基を示し、Zは官能基（反応基）を示し相互に結合してもよく、spacerは(—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—)<sub>p</sub>または(—NHCHR<sup>3</sup>CO—)<sub>q</sub>を示し、R<sup>3</sup>はHまたは炭素数1～3のアルキル基を示し、mは1以上の整数を、nは100～20000の整数を、pおよびqは独立して0または1～8の整数を、rは1以上の整数を示す）

【請求項 14】 一般式 [I] で表される疎水結合性吸着ポリマーが、メチルビニルエーテルと無水マレイン酸との交互共重合体である請求項 13 記載の細胞培養基質。

【請求項 15】 請求項 1～14 記載の細胞培養基質に、リンカーを固相化し、目的とする細胞を播種し、培養することを特徴とする人工組織の製造方法。

【請求項 16】 リンカーが、細胞接着蛋白質、細胞接着ペプチドまたは蛋白性支持体である請求項 15 記載の人工組織の製造方法。

【請求項 17】 細胞接着蛋白質が、フィブロネクチン（FN）、コラーゲン（Co1）、ラミニン（LN）またはビトロネクチン（VN）である請求項 1

6 記載の人工組織の製造方法。

【請求項 18】 細胞接着ペプチドが、請求項 17 記載の細胞接着蛋白質の  
アミノ酸配列の中で、細胞接着に関わる領域のペプチドである請求項 16 記載の  
人工組織の製造方法。

【請求項 19】 目的とする細胞が、上皮細胞、内皮細胞または間充織細胞  
である請求項 15 記載の人工組織の製造方法。

【請求項 20】 上皮細胞が、表皮細胞、角膜上皮細胞、肺胞上皮細胞、消  
化器系の粘膜上皮細胞、腎臓子球体上皮細胞または肝実質細胞である請求項 19  
記載の人工組織の製造方法。

【請求項 21】 内皮細胞が、腎臓子球体毛細胞、血管内皮細胞、肺動脈血  
管内皮細胞、胎盤静脈血管内皮細胞または大動脈血管内皮細胞である請求項 19  
記載の人工組織の製造方法。

【請求項 22】 間充織細胞が、筋細胞、脂肪細胞、グリア細胞、シュワン  
細胞または神経細胞（ニューロン）である請求項 19 記載の人工組織の製造方法  
。

【請求項 23】 人工組織が、人工表皮組織、人工角膜上皮組織、人工肺胞  
上皮組織、人工気道上皮組織、人工腎糸球体組織、人工肝実質組織もしくは人工  
肺動脈血管内皮組織、または人工血管、人工肺、人工肝、人工腎臓、人工皮膚も  
しくは人工角膜である請求項 15～22 記載の人工組織の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、細胞培養基質表面に疎水結合性吸着ポリマーでコーティングされて  
いる細胞培養基質および該細胞培養基質にリンカーを介し、細胞を播種し、培養  
することにより調製される人工組織の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

動物の体の内外の表面を覆っている細胞層である表皮、角膜上皮、肺胞上皮、  
消化器系の粘膜上皮、腎臓子球体上皮、肝実質細胞等の上皮組織は、外界から異

物（微生物、アレルゲン、化学物質等）が侵入するのを防いでいる。かかる上皮組織を構成する上皮細胞の外界面は上端面（apical surface）、内側下面は基底面（basal surface）と呼ばれ、かかる基底面直下には、蛋白質やプロテオグリカン等の細胞外基質（ECM）から成る細胞を含まない基底膜と呼ばれる50～100nmの薄膜の構造体が存在する。基底膜は、未成熟な上皮細胞が増殖し、成熟した細胞に分化して、本来の形態や、機能を発現するのに必須の構造体と考えられている。即ち、基底膜なしでは上皮組織は自分自身の維持や本来のパフォーマンスが達成できない。多層または単層の上皮細胞層はバリアーとして外界からの異物の侵入を防いでいるが、基底膜自体も物理的なバリアーとして作用する。このように、上皮組織を構成する上皮細胞と基底膜が協働して、強固なバリアーを形成し、体内の生命活動を保護している。

#### 【0003】

上皮細胞の他、内皮細胞、筋細胞、脂肪細胞、シュワン細胞などの実質細胞と結合組織との界面に形成される細胞外基質の特異な膜状構造物である基底膜は、生体の各組織・臓器に普遍的に見い出される一方で、腎糸球体毛細血管ループや神経シナプス膜など高度に特化したものもある。したがって、細胞を間質に接着させるだけでなく、選択的な物質・細胞透過や細胞分化の誘導等の機能が明らかにされている。腎糸球体では、基底膜の陰性荷電が腎のろ過機能を担っているとみなされ、その陰性荷電は現在パールカンとよばれるヘパラン硫酸プロテオグリカン（HSPG）によることが古典的に知られている。HSPGは腎糸球体基底膜だけでなく、種々の基底膜に、IV型コラーゲン、ラミニン、エンタクチン（ニドジェン）等と同様に、その基本的構成分子として広く分布している。

#### 【0004】

細胞外マトリックス、特に基底膜は、上記のように個体の発生や分化等の生理現象だけでなく、癌の増殖転移や炎症などの病態形成にも深く関与していることが明らかとなりつつあり、その構成タンパク質の機能の解明が重要な課題となってきた。例えば、基底膜の主要糖タンパク質であるラミニンは、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ の3種類のサブユニットからなる複合体で、15種類のアイソフォームが知られており、これらが組織特異的あるいは発生時の各段階で特異的に発現している。

ラミニンは様々な生物活性を有している分子量90万の複雑な巨大分子である。ラミニンのリセプターとしては、 $\alpha 6 \beta 1$ 等のインテグリン分子、 $\alpha$ -ジストグリカン ( $\alpha$ -DG)、シンデカン-1~4のヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) が報告されている。

#### 【0005】

細胞が接着可能な薄い細胞外マトリックス層である基底膜の構成成分と上皮細胞との相互作用が、移動、増殖および分化等の細胞機能に影響を及ぼしている（例えば、非特許文献1参照。）。基底膜の主要成分としては、前記のように、ラミニン、IV型コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) およびエンタクチン (ニドジェン) が知られており（例えば、非特許文献2参照。）、ラミニン及びIV型コラーゲンのアイソフォームを含む基底膜成分の合成には、間充織細胞が重要な役割を担っていると考えられている（例えば、非特許文献3、4参照。）が、上皮細胞の役割もまた、重要なものである。HSPGは、上皮細胞由来と考えられているが、ラミニン、IV型コラーゲンおよびエンタクチン (ニドジェン) は、上皮細胞および間充織細胞の双方によって、インビボで合成される（例えば、非特許文献5、6参照。）。連続した緻密層 (lamina densa) を示すインビトロでの上皮組織モデルを作製する試みが、今まで数多く行われてきた。腸（例えば、非特許文献7参照。）および皮膚（例えば、非特許文献8、9、10参照。）等の組織モデルが研究されており、いくつかの間充織細胞由来基底膜成分が、基底膜形成に重要な役割を果たしていることも見い出されている。

#### 【0006】

従来から、上皮細胞を培養することにより基底膜を構築し、基底面直下に基底膜構造体が存する上皮組織を構築する幾つかの方法が報告されている。例えば、本発明者は、肺胞上皮細胞と肺線維芽細胞との共培養によりインビトロで基底膜が形成されることを報告した（例えば、非特許文献11参照。）。すなわち、肺線維芽細胞をI型コラーゲンゲルに包埋した状態で培養すると、肺線維芽細胞によってコラーゲンゲルは収縮し、堅さを増す。また、肺線維芽細胞から分泌された細胞外基質は、細胞周囲のコラーゲン線維にまわりついて沈着する。その形成物はインビボにおける間質と類似することから、擬似間質と呼ぶことができる。

肺線維芽細胞からは、ラミニン、IV型コラーゲン、パールカン、エンタクチン（ニドジェン）等の基底膜構成成分も、培地中に分泌される。この擬似間質化したI型コラーゲン線維上で、肺胞II型上皮細胞株（SV40-T2）を14日間程度培養する（T2-Fig 1）と、肺線維芽細胞から分泌された基底膜構成成分が、上記肺II型上皮細胞株の基底面にまで拡散・到達し、基底膜構築の材料として使われる結果、基底膜構造体が形成されることを報告した。

#### 【0007】

また、希薄な中性コラーゲン溶液を、5%CO<sub>2</sub>中37℃でインキュベートし、コラーゲン線維を形成させた後、無菌状態の中で風を当てて乾燥させた風乾コラーゲン線維基質（fib）を、上記擬似間質の代替物として用い、上記肺胞上皮細胞と肺線維芽細胞との共培養の場合と同様にして、基底膜を形成することも報告されている（例えば、非特許文献12、13参照。）。この方法の場合、コラーゲン溶液の濃度が高いと、形成されたコラーゲン線維に隙間が少なく、あるいは無くなって、基底膜形成のため上皮細胞を長期間培養（10日～2週間）すると、細胞が剥がれて浮き上がることから（例：Becton Dickinson, Fibrillar collagen coat culture insert）、コラーゲン溶液濃度は、0.3～0.5mg/mlが最適であるとされている（例えば、非特許文献12、13参照。）。

#### 【0008】

線維芽細胞を包埋したコラーゲンマトリックスを使用する代わりに、マトリゲル（Matrigel；Becton Dickinson社の登録商標）を共存させ、コラーゲン線維基質上で肺胞II型上皮細胞株（SV40-T2）を培養した。このときマトリゲルは、基底膜成分の外來性（exogenous）供給源として機能した。マトリゲルは、Engelbreth-Holm-Swarm腫瘍マトリックスから抽出された基底膜調製物であり（例えば、非特許文献14参照。）、ECM合成に影響を及ぼす可能性のある種々のサイトカインの他に、ラミニン-1、エンタクチン（ニドジェン）、IV型コラーゲン、パールカンを含んでいる（例えば、非特許文献15参照。）。基底膜に取り込まれたマトリゲル由来の成分を追跡するために、マトリゲルをビオチンで標識した。標識された基底膜成分の中でも、主としてラミニン-1とエンタクチン（ニドジェン）が培地中に拡散し、肺胞上皮細胞が形成する基底膜中に取り込ま



れた。また、基底膜成分を免疫蛍光染色し（蛍光）顕微鏡で観察すると、マトリゲル量に依存して基底膜形成が促進すること、および点状に分泌・沈着された基底膜マトリックス成分がシート状に拡大し、やがて基底膜へと発達して行く過程が観察された。これらの結果から、肺胞上皮細胞の基底面下方から供給された外来性ラミニン-1 およびエンタクチン（ニドジェン）が、インビトロでの上記上皮細胞による完全な基底膜の形成に大きく関与していることが明らかになっている（例えば、非特許文献13参照。）。

#### 【0009】

また、細胞をインビトロで付着させ、培養する方法として、疎水性組織培養表面に生体分子を結合させた末端基活性化ポリマー（EGAP）に吸着させ、細胞を生体分子が結合したEGAPコート表面上に播種し、増殖させる方法が開示されている（特許文献1）。

#### 【0010】

##### 【非特許文献1】

Crouch et al., Basement membrane. .In The Lung(ed .R. G. Crystal and J. B. West), pp53.1-53.23. Philadelphia : Lippincott-Raven. 1996

##### 【非特許文献2】

Curr. Opin. Cell Biol. 6, 674-681, 1994

##### 【非特許文献3】

Matrix Biol. 14, 209-211, 1994

##### 【非特許文献4】

J. Biol. Chem. 268, 26033-26036, 1993

##### 【非特許文献5】

Development 120, 2003-2014, 1994

##### 【非特許文献6】

Gastroenterology 102, 1835-1845, 1992

##### 【非特許文献7】

J. Cell Biol. 133, 417-430, 1996

##### 【非特許文献8】

J. Invest. Dermatol. 105, 597-601, 1995

【非特許文献 9】

J. Invest. Dermatol. 109, 527-533, 1997

【非特許文献 1 0】

Dev. Dynam. 197, 255-267, 1993

【非特許文献 1 1】

Cell Struc. Func., 22: 603-614, 1997

【非特許文献 1 2】

Eur. J. Cell Biol., 78: 867-875, 1999

【非特許文献 1 3】

J. Cell Sci., 113: 859-868, 2000

【非特許文献 1 4】

J. Exp. Med. 145, 204-220, 1977

【非特許文献 1 5】

Exp. Cell Res. 202, 1-8, 1992

【非特許文献 1 1】

Clement et al., Exp. Cell Res., 196: 198-205, 1991

【特許文献 1】

特表 2 0 0 1 - 5 1 2 5 6 5

【0 0 1 1】

【発明が解決しようとする課題】

培養細胞が基質に接着する際には、細胞表面に存在するインテグリン等のリセプター分子を使って接着するのが一般的である。このため、細胞が特異的なリセプターを使って基質に接着することを誘導するには、細胞接着活性を有する細胞外基質等がリンカーとして利用される。細胞外基質には、代表的なものとしてフィブロネクチン（FN）、コラーゲン（C o l）、ラミニン（LN）およびビトロネクチン（VN）等の蛋白質（以後、細胞接着蛋白質と記す）が知られている。これらの蛋白質は、プラスチック培養皿との疎水結合を利用して、非共有結合で吸着させ、これらの上に上皮細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞等を播種させ、

細胞培養を行うための基質として利用されている。しかし、細胞接着蛋白質は高価な上、蛋白質の一般的性質である変成や分解をうけ易く、価格、安定性や保存性等に問題を有している。

#### 【0012】

また、細胞接着蛋白質のアミノ酸配列の中で、細胞接着に関わる領域のペプチドを上記と同様の方法を用いてプラスチック培養皿に吸着させ、細胞培養の基質として用いることが出来る。接着蛋白質に比して、容易に化学合成できるペプチドを接着ペプチドとして用いる方法は、大量生産が容易である点や、構造が比較的安定なことから、細胞接着基質に用いる利点がある。しかし、低分子故にその吸着効率はたんぱく質に比して著しく低く、数パーセント程度しか吸着しない。また、ペプチドにとっても、プラスチックに吸着されて運動の自由度を奪われている状態では、細胞側の受容体と結合するのが難しい。また、一旦吸着したペプチドも、その後、徐々に遊離する。従って、ペプチドを用いた細胞接着の再現性は芳しく無く、工業製品としての価値は低い。

#### 【0013】

本発明は、培養皿等の細胞培養基質に効率よく吸着し、細胞接着の再現性に優れた、細胞培養基質表面に疎水結合性吸着ポリマーでコーティングされている細胞培養基質および該細胞培養基質にリンカーを介し、細胞を播種し、培養することにより調製された人工組織の製造方法を提供することにある。

#### 【0014】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、培養細胞が基質に接着することを誘導するために、細胞培養に用いる親水性処理をしたプラスチック製培養皿に代わって、細胞接着のリガンド（リセプターの結合相手となる細胞外基質分子）で培養皿の疎水性表面をコーティングする方法を見だし、本発明を完成するに至った。この方法は、細胞接着の受け手であるリガンドとそのリガンドを固相化するための相手となる培養皿が、非共有結合（疎水結合）で結合することを利用する方法である。

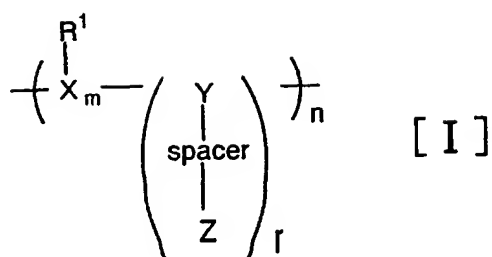
#### 【0015】

すなわち、本発明は、分子内に疎水性を有する直鎖状骨格と蛋白質またはペプ

チドと反応しうる官能基とを有している疎水結合性吸着ポリマーでコーティングされていることを特徴とする細胞培養基質（請求項 1）や、細胞培養基質の基材が、生物性ポリマー、プラスチック、天然または合成ゴム、無機物または金属からなる請求項 1 記載の細胞培養基質（請求項 2）や、生物製ポリマーが、コラーゲン、ゼラチン、セルロースまたはポリ乳酸である請求項 2 記載の細胞培養基質（請求項 3）や、プラスチックが、熱可塑性樹脂または熱硬化性樹脂である請求項 2 記載の細胞培養基質（請求項 4）や、熱可塑性樹脂が、アクリル樹脂、ポリ塩化ビニル樹脂、ポリエチレン樹脂、ポリスチレン樹脂、ポリプロピレン樹脂、ポリメチルペンテン樹脂またはフッ素樹脂等である請求項 4 記載の細胞培養基質（請求項 5）や、熱硬化性樹脂が、フェノール樹脂、尿素樹脂、エポキシ樹脂、メラミン樹脂またはシリコン樹脂である請求項 4 記載の細胞培養基質（請求項 6）や、合成ゴムが、ブタジエンスチレンゴム、ブタジエンアクリロニトリルゴム、ブチルゴム、多硫化系合成ゴム、フッ素ゴムまたはシリコンゴムである請求項 2 記載の細胞培養基質（請求項 7）や、無機物が、ガラス、ヒドロキシアパタイト、IC 基材またはカーボンナノチューブである請求項 2 記載の細胞培養基質（請求項 8）や、金属が、不活性（i n e r t）な金、白金、チタンあるいはこれらの酸化物である請求項 2 記載の細胞培養基質（請求項 9）や、請求項 2～9 記載の基材からなる細胞培養基質が、培養皿（ウェル）、プリント配線板または人工臓器である請求項 1～9 記載の細胞培養基質（請求項 10）や、人工臓器が、人工血管、人工心肺または人工腎臓である請求項 10 記載の細胞培養基質（請求項 11）や、細胞培養基質が、シリコンゴムを材質とした培養皿（ウェル）である請求項 1 または 10 記載の細胞培養基質（請求項 12）や、疎水結合性吸着ポリマーが、以下の一般式 [I] で表される請求項 1～12 記載の細胞培養基質。

【0016】

【化2】



【0017】

(式中、XはCHまたはNHCHCOを示し、YはCHまたはNCR<sup>2</sup>COを示し、R<sup>1</sup>はH、炭素数1～3のアルキル基、炭素数1～3のアルコキシ基、炭素数6～8のアリールまたはアラアルキル基または炭素数6～8のアリールオキシまたはアラアルキルオキシ基を示し、R<sup>2</sup>はHまたは炭素数1～3のアルキル基を示し、Zは官能基(反応基)を示し相互に結合してもよく、spacerは(—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—)<sub>p</sub>または(—NHCHR<sup>3</sup>CO—)<sub>q</sub>を示し、R<sup>3</sup>はHまたは炭素数1～3のアルキル基を示し、mは1以上の整数を、nは100～20000の整数を、pおよびqは独立して0または1～8の整数を、rは1以上の整数を示す)(請求項13)や、一般式【I】で表される疎水結合性吸着ポリマーが、メチルビニルエーテルと無水マレイン酸との交互共重合体である請求項13記載の細胞培養基質(請求項14)に関する。

【0018】

さらに、本発明は、請求項1～14記載の細胞培養基質に、リンカーを固相化し、目的の細胞を播種し、培養することにより調製されることを特徴とする人工組織の製造方法(請求項15)や、リンカーが、細胞接着蛋白質、細胞接着ペプチドまたは蛋白性支持体である請求項15記載の人工組織の製造方法(請求項16)や、細胞接着蛋白質が、フィブロネクチン(FN)、コラーゲン(Co1)、ラミニン(LN)またはビトロネクチン(VN)である請求項16記載の人工組織の製造方法(請求項17)や、細胞接着ペプチドが、請求項17記載の細胞接着蛋白質のアミノ酸配列の中で、細胞接着に関わる領域のペプチドである請求

項 16 記載の人工組織の製造方法（請求項 18）や、目的とする細胞が、上皮細胞、内皮細胞または間充織細胞である請求項 15 記載の人工組織の製造方法（請求項 19）や、上皮細胞が、表皮細胞、角膜上皮細胞、肺胞上皮細胞、消化器系の粘膜上皮細胞、腎臓子球体上皮細胞または肝実質細胞である請求項 19 記載の人工組織の製造方法（請求項 20）や、内皮細胞が、腎臓子球体毛細胞、血管内皮細胞、肺動脈血管内皮細胞、胎盤静脈血管内皮細胞または大動脈血管内皮細胞である請求項 19 記載の人工組織の製造方法（請求項 21）や、間充織細胞が、筋細胞、脂肪細胞、グリア細胞、シュワン細胞または神経細胞（ニューロン）である請求項 19 記載の人工組織の製造方法（請求項 22）や、人工組織が、人工表皮組織、人工角膜上皮組織、人工肺胞上皮組織、人工気道上皮組織、人工腎糸球体組織、人工肝実質組織もしくは人工肺動脈血管内皮組織、または人工血管、人工肺、人工肝、人工腎臓、人工皮膚もしくは人工角膜である請求項 15～22 記載の人工組織の製造法（請求項 23）に関する。

#### 【0019】

##### 【発明の実施の形態】

本発明の細胞培養基質は、基材として、例えば、生物製ポリマー、プラスチック、天然または合成ゴム、無機物または金属を使用した細胞培養基質が挙げられる。

生物製ポリマーとしては、コラーゲン、ゼラチン、セルロース等および生分解性ポリマーのポリ乳酸等が例示される。

プラスチックとしては、熱可塑性樹脂または熱硬化性樹脂何れの樹脂も使用することができ、熱可塑性樹脂としては、例えば、アクリル樹脂、ポリ塩化ビニル樹脂、ポリエチレン樹脂、ポリスチレン樹脂、ポリプロピレン樹脂、ポリメチルペンテン樹脂またはフッ素樹脂等が、熱硬化性樹脂としては、例えば、フェノール樹脂、尿素樹脂、エポキシ樹脂、メラミン樹脂またはシリコン樹脂等が例示される。

#### 【0020】

合成ゴムとしては、例えば、ブタジエンスチレンゴム、ブタジエンアクリロニトリルゴム、ブチルゴム、多硫化系合成ゴム、フッ素ゴムまたはシリコンゴム等

が例示されるが、特に、シリコンゴムが好ましい。

無機物としては、ガラス、ヒドロキシアパタイト、シリコン等の IC 基材またはカーボンナノチューブ等が例示される。

金属としては、不活性 (inert) な金、白金、チタンあるいはこれらの酸化物等が例示される。

特にガラスについて、今日のようにプラスチックが汎用される以前は、培養基質としてガラスが使われていた。しかし、接着効率の不安定さや繰り返し使用することによる表面の凹凸等により、現在はプラスチックに取って代わられている。しかし、その光学透明性は、優れた特性であり、本発明は、平坦な表面のガラスまたは表面加工を施したガラスに対しても、適用することができる。

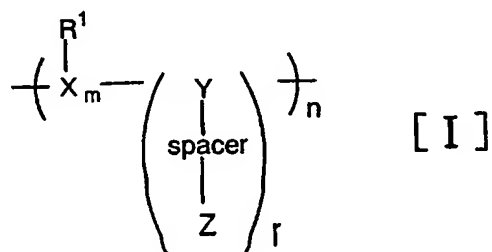
#### 【0021】

細胞培養基質は、培養皿（ウェル）、プリント配線板または人工臓器等に用いられ、人工臓器としては、人工血管、人工心肺または人工腎臓等が例示される。また、シリコンゴムを基材として作製された培養皿（ウェル）に、好ましく用いられる。

疎水結合性吸着ポリマーとしては、分子内に疎水性を有する直鎖状炭素骨格と蛋白質またはペプチドと反応しうる官能基とを有する疎水結合性吸着ポリマーであって、以下の一般式 [I]

#### 【0022】

#### 【化3】



(式中、XはCHまたはNHCHCOを示し、YはCHまたはNCR<sup>2</sup>COを示し、R<sup>1</sup>はH、炭素数1～3のアルキル基、炭素数1～3のアルコキシ基、炭

素数 6～8 のアリールまたはアラアルキル基または炭素数 6～8 のアリールオキシまたはアラアルキルオキシ基を示し、 $R^2$  は H または炭素数 1～3 のアルキル基を示し、Z は官能基（反応基）を示し相互に結合してもよく、spacer は  $(-CH_2-CH_2-)_p$  または  $(-NHCH(R^3)CO-)_q$  を示し、 $R^3$  は H または炭素数 1～3 のアルキル基を示し、m は 1 以上の整数を、n は 100～20000 の整数を、p および q は独立して 0 または 1～8 の整数を、r は 1 以上の整数を示す）で表され、一般式 [I] 中、炭素数 1～3 のアルキル基としては、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基等を、炭素数 1～3 のアルコキシ基としては、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、イソプロポキシ基等を、炭素数 6～8 のアリールまたはアラアルキル基としては、フェニル基、ベンジル基、フェネチル基を、炭素数 6～8 のアリールオキシまたはアラアルキルオキシ基としては、フェノキシ基、ベンジルオキシ基、フェネチルオキシ基等を挙げることができる。

#### 【0023】

かかる疎水結合性吸着ポリマーとしては、細胞培養基質表面に吸着することができる疎水結合性吸着ポリマーであって、分子内にポリアルキレン鎖あるいは直鎖状アミノ酸ポリマー（ポリグリシン、ポリアラニン、ポリバリン、ポリロイシン、ポリフェニルアラニン等）やその誘導体などの疎水性の直鎖状骨格をもつ疎水結合性吸着ポリマーで、該疎水性の直鎖状骨格に直接、あるいは、スペーサーを介して蛋白質あるいはペプチドと反応できる反応性の官能基（反応基）とを有する疎水結合性吸着ポリマーを好適に用いることができる。かかる一般式 [I] における n の範囲としては 100～20000 であり、一般式 [I] で表される疎水結合性吸着ポリマーの分子量は 15,000～3,200,000 程度のものが好ましい。

#### 【0024】

上記反応基としては、蛋白質あるいはペプチドの官能基と反応して、結合するものであれば特に制限されるものではなく、例えば、カルボキシル基、アミノ基、メルカプト基、水酸基およびこれらの反応性誘導体等を例示することができる。また、蛋白質あるいはペプチドの官能基としては、蛋白質あるいはペプチド



の末端あるいは側鎖由来の上記と同様のカルボキシル基、アミノ基、メルカプト基、水酸基およびこれらの反応性誘導体等を例示することができる。蛋白質あるいはペプチドの官能基と疎水結合性吸着ポリマーの反応基と反応し結合させる方法は、通常のパепチド合成に用いられている方法が利用できる。例えば、カルボキシル基は、縮合剤の存在下に、あるいは酸ハロゲン化物、酸無水物、活性エステル等の反応性誘導体として、アミノ基、メルカプト基あるいは水酸基と反応させることが出来る。上記酸無水物の反応基としては、無水マレイン酸基を好適に例示することができ、蛋白質あるいはペプチドのN末端アミノ基、または、アミノ酸側鎖、例えば、リジンε-アミノ基、メルカプト基、水酸基等の官能基と結合する。アミノ基は、縮合剤の存在下に、あるいはイソシアナート等の反応性誘導体として、カルボキシル基と反応させることが出来る。メルカプト基は蛋白質あるいはペプチドのメルカプト基と主として反応し、時には、S-S結合とSS交換反応で結合することもある。また、水酸基は、カルボキシル基と上記と同様に、縮合剤あるいはカルボキシル基の反応性誘導体と反応させることができる。そして、かかる反応基あるいは官能基に、前記疎水性の直鎖状骨格とコポリマーを形成することができる範囲内で、簡単に外れる可逆的な保護基をつけることもできる。

#### 【0025】

かかる反応基を有する疎水結合性吸着ポリマーとしては、エチレン、プロピレン等のアルキレンや、メチルビニルエーテル、エチルビニルエーテル、エチル-1-プロペニルエーテル等の不飽和エーテルや、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン等のαアミノ酸等などから選択できる1種又は2種以上と、無水マレイン酸、マレインイミド等の無水カルボン酸や酸イミドや、アクリル酸、アクリルアミド、アクリロニトリル等のオレフィン類や、システイン等のメルカプト基を有するアミノ酸や、セリン、スレオニン等の水酸基を有するアミノ酸や、アスパラギン酸、グルタミン酸等のモノアミノジカルボン酸や、リシン等のジアミノモノカルボン酸などから選択できる1種又は2種以上との共重合体を挙げることができる。これらの共重合体はそれぞれ二量体、三量体等が相互に重合した共重合体であってもよいが、交互共重合体であるこ

とが好ましい。また、メルカプト基あるいは水酸基を有するアミノ酸、モノアミノジカルボン酸、ジアミノモノカルボン酸等の場合は、これらの単縮重合体は、縮合により形成される疎水性の直鎖状骨格に官能基を有する構造となるため、本発明の反応基を有する疎水結合性吸着ポリマーとして適用することができる。

#### 【0026】

これらのうちで、本発明の反応基を有する疎水結合性吸着ポリマーとして、無水マレイン酸と、メチルビニルエーテル、エチルビニルエーテル、エチルー１－プロペニルエーテル等の不飽和エーテルとの交互共重合体が代表例として例示され、特に、無水マレイン酸とメチルビニルエーテルとの交互共重合体であるMMAC (methyl vinyl ether / maleic anhydride copolymer) を具体例として挙げることができる。MMAC等の場合、メチレン基を骨格とする直鎖ポリマーが、細胞培養基質表面に疎水性結合で吸着することを可能にしているが、ポリアルキレン骨格だけだとあまりにも疎水性で、水との親和性が低くなり、微視的には水をはじいて、反応性に支障がでる可能性があり、そこで、メチレン基の水素原子の一部を上述のように、例えば、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、イソプロポキシ基等のアルコキシ基や、フェノキシ基、ベンジルオキシ基、フェネチルオキシ基等で置換したものは、酸素原子の存在により反応効率が高まると考えられる。なお、アルコキシ基に代えて水酸基で置換すると、分子間で無水カルボン酸とエステル結合を作ることから好ましくない。そして、MMACにおける反応基である無水マレイン酸は、蛋白質あるいはペプチドのアミノ基または水酸基と結合することになるが、この無水マレイン酸がたとえ水と反応してカルボン酸になったとしても、蛋白質あるいはペプチドの陽電荷とイオン結合することができる。

#### 【0027】

なお、疎水結合性吸着ポリマーは、使用する細胞培養基質の材質あるいは使用目的により適宜選択される。例えば、前記のMMACは、メチレン骨格を持つポリマーであるが、懸かるポリエチレン、ポリプロピレン等のポリアルキレンを主鎖とするポリマーは柔軟性を有しており、例えば、伸展運動を繰り返すシリコンゴム製培養皿をコーティングする目的には適した素材である。他方、スチレン骨

格を持つ反応性ポリマーは、フェニル基を側鎖に有しているため、電気的性質が優れており、骨格構造は剛直である。この為、例えば、ポリスチレンの様に疎水性が高く堅い基材や、電子特性の優れたカーボンナノチューブ、あるいは電気伝導性の優れた金や白金等の金属やその酸化物を細胞培養基質として使用する際のコーティングに適している。

#### 【0028】

そして、上記疎水結合性吸着ポリマーは、疎水性の直鎖状骨格により、化学結合でなく疎水性結合で細胞培養基質表面に吸着されることから、細胞培養基質の種類や材質に関係なく吸着することができる。その理由は、長い主鎖の局所では接着面から乖離することがたとえ有るとしても、他の殆どの部分では結合している故に、乖離した部分もそれほど接着面から離れることはできない。その結果、両者は程なく疎水結合で再度結合し、乖離は一時的なものになると考えられる。細胞接着蛋白質あるいはペプチドが強く疎水結合できない物質であっても、この疎水結合性吸着ポリマーは、その長い疎水性主鎖によって強固に細胞培養基質に結合することができる。

#### 【0029】

細胞培養基質に疎水結合性吸着ポリマーをコーティングし、さらに、リンカーを固相化する方法としては、細胞培養基質に該ポリマーをあらかじめ塗布し、吸着させた後、該ポリマーの蛋白質またはペプチドと反応しうる官能基とリンカーとを反応させることにより調製することが出来る。疎水結合性吸着ポリマーを細胞培養基質に塗布する場合には、細胞培養基質表面を侵さない溶媒を用いる必要がある。例えば、細胞培養基質としてプラスチックを用い、MMACを塗布する場合、MMACはアセトンに易溶であるが、アセトンはプラスチック表面を侵す。しかし、プラスチックを侵さないn-ヘキサンに対しては、MMACは難溶性である。このため、極性溶媒でプラスチック表面も侵さないエタノールを用いるのが良い。この様に、MMACは、エタノールに可溶のため、アセトン等を必要とするポリマーよりも使い易い上に、塗布後に簡単に風乾できる。また、エタノール溶液等として細胞培養基質表面のコーティング処理に用いる場合のMMAC濃度としては、 $2\mu\text{g}/\text{ml} \sim 1\text{mg}/\text{ml}$ 、特に $10 \sim 100\mu\text{g}/\text{ml}$ が好

適であり、かかるコーティング処理を所望する接着の程度に応じて1～3回繰り返すこともできる。プラスチック表面に疎水結合で吸着されたMMA Cとリンカーとは、室温～50℃、好ましくは37℃で、pH 7～11の中性ないしアルカリ性で10分～48時間反応させることにより固相化させることが出来る。

#### 【0030】

また、疎水結合性吸着ポリマーの蛋白質またはペプチドと反応しうる官能基とリンカーとを予め反応させ、該反応物を細胞培養基質に塗布することによりリンカーを固相化した細胞培養基質を調製することも出来る。

ここで、細胞培養基質に吸着した疎水結合性吸着ポリマーに固相化できるリンカーとしては、該ポリマーが有している官能基と反応して、結合しうるものであれば特に制限されるものではないが、細胞接着蛋白質、細胞接着ペプチドおよび蛋白性支持体等が挙げられる。

#### 【0031】

細胞接着蛋白質としては、フィブロネクチン (FN)、コラーゲン (CoI)、ラミニン (LN) およびビトロネクチン (VN) 等が挙げられる。

細胞接着ペプチドとしては、上記した細胞接着蛋白質のアミノ酸配列の中で、細胞接着に関わる領域のペプチドであればいずれでも用いることができる。これらペプチドの長さとしては、3～20個、好ましくは8～15個、より好ましくは9～12個のアミノ酸残基である。FN蛋白質の細胞接着に関わる領域のペプチドとしては、細胞側のインテグリン受容体と結合する特異的なRGDアミノ酸配列を有するペプチドが好ましく、例えば、具体的配列として、Tyr-Ala-Val-Thr-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Ala-Ser (FIB-1) が例示される。また、上皮細胞、血管内皮細胞、筋肉細胞、神経細胞 (ニューロン) 等の機能発現に特に重要と考えられているLN蛋白質の細胞接着に関わる領域のペプチドとしては、 $\alpha$ 鎖のG領域 (G-domain) ペプチドが好ましく、例えば、マウスのLN由来である、Arg-Lys-Arg-Leu-Gln-Val-Gln-Leu-Ser-Ile-Arg-Thr (AG73)、Leu-Gln-Gln-Arg-Arg-Ser-Val-Leu-Arg-Thr-Lys-Ile (AG73T)、Val-Lys

-Thr-Glu-Tyr-Ile-Lys-Arg-Lys-Ala-Phe-Met (AG81.5)、Val-Lys-Thr-Glu-Tyr-Ile-Lys-Arg-Lys-Ala-Phe-Nle (AG81.5X)、Lys-Asn-Arg-Leu-Thr-Ile-Glu-Leu-Glu-Val-Arg-Thr (A2, A2G73)、Lys-Pro-Arg-Leu-Gln-Phe-Ser-Leu-Asp-Ile-Gln-Thr (A3G72)、Thr-Leu-Phe-Leu-Ala-His-Gly-Arg-Leu-Val-Phe-Met (A4G82)、Thr-Leu-Phe-Leu-Ala-His-Gly-Arg-Leu-Val-Phe-Nle (A4G82X)、Gly-Pro-Leu-Pro-Ser-Tyr-Leu-Gln-Phe-Val-Gly-Ile (A5G71)、Arg-Asn-Arg-Leu-His-Leu-Ser-Met-Leu-Val-Arg-Pro (A5G73)、Arg-Asn-Arg-Leu-His-Leu-Ser-Nle-Leu-Val-Arg-Pro (A5G73X)、Leu-Val-Leu-Phe-Leu-Asn-His-Gly-His-Phe-Val-Ala (A5G77) または Leu-Val-Leu-Phe-Leu-Asn-His-Gly-His (A5G77f) 等が、また、ヒトLN由来の、Lys-Asn-Ser-Phe-Met-Ala-Leu-Tyr-Leu-Ser-Lys-Gly (hA3G75) または Gly-Asn-Ser-Thr-Ile-Ser-Ile-Arg-Ala-Pro-Val-Tyr (hA3G83) 等が例示される。かかる細胞接着ペプチドは、通常のペプチド合成法により入手可能である。

### 【0032】

また、タンパク性支持体としては、線維芽細胞を包埋したコラーゲングル（線維性コラーゲンマトリックス）等のコラーゲン線維の他、（合成）エラスチンポリマー、コラーゲン線維と（合成）エラスチンポリマーとの混合物等を挙げることができるが、栄養塩、老廃物の拡散を確保する点で線維性コラーゲンマトリックスが好ましく、かかる線維性コラーゲンマトリックスとしては、線維芽細胞によって収縮されるコラーゲングルの高密度マトリックスを用いることもできる。

この場合、コラーゲンの生合成を高めるため、ascorbic acid-2-phosphate (Asc-P) を添加することもできる。中性 I 型コラーゲン溶液を CO<sub>2</sub> インキュベーター内で静置してインキュベートし、ポリマー化したゲルを、室温下に風乾した線維性コラーゲンマトリックスを用いることもできる。

#### 【0033】

固相化されたリンカー上に目的とする細胞を播種し、培養することにより人工組織を調製することが出来る。かかる人工組織の製造方法としては、固相化されたリンカー上に目的とする細胞を播種し、培養する方法であれば特に制限されることはなく、目的の細胞を播種するだけで、播種された細胞は接着し、その後速やかに伸展する。培養液に特に血清は必要ないが、1%程度の低濃度（通常の細胞培養では10%程度使用される）を添加すれば、接着、伸展は更に促進される。

#### 【0034】

固相化したリンカー上に播種し、培養することのできる細胞としては、例えば、上皮細胞、内皮細胞または間充織細胞等を挙げることができ、上皮細胞としては、例えば、表皮細胞、角膜上皮細胞、肺胞上皮細胞、消化器系の粘膜上皮細胞、腎臓子球体上皮細胞または肝実質細胞等を、内皮細胞としては、例えば、腎臓子球体毛細胞、血管内皮細胞、肺動脈血管内皮細胞、胎盤静脈血管内皮細胞または大動脈血管内皮細胞等を、間充織細胞としては、例えば、筋細胞、脂肪細胞、グリア細胞、シュワン細胞または神経細胞（ニューロン）等をより具体的に例示することができる。

#### 【0035】

さらに、上記例示した細胞等をリンカー上に培養し形成される細胞層を含むヒト等の人工組織（人工臓器も含む）としては、例えば、人工表皮組織、人工角膜上皮組織、人工肺胞上皮組織、人工気道上皮組織、人工腎糸球体組織、人工肝実質組織、人工肺動脈血管内皮組織等の人工組織や、人工血管、人工肺、人工肝、人工腎臓、人工皮膚、人工角膜等の人工臓器を具体的に挙げることができる。

#### 【0036】

そして、疎水結合性吸着ポリマーでコーティングされた細胞培養基質上にリン

カーを介して形成された人工組織は、上記疎水結合性吸着ポリマーが化学結合でなく疎水性結合で細胞培養基質表面に吸着されていることから、細胞培養基質の種類や材質に関係なく吸着することができ、また、所望時には、細胞培養基質表面から物理的に剥離させることができる。剥離された人工組織は、基底膜の構造を保持したままで移植が可能なることから、その汎用性が一層高く、その適用例として、内径 3 mm 以下の微細人工血管や、体内埋込み型のヒト人工組織等を例示することができ、特に、人工子球体、人工肝臓、人工肺胞など上皮組織と内皮組織が近接する組織や臓器を好適に例示することができる。

#### 【0037】

インビトロにおける組織や臓器形成あるいは組織再生を行う際に、力学的支持体である細胞培養基質表面に直接またはリンカーを介して細胞を播種する方法は、細胞培養基質表面を親水加工しても、長期間細胞剥離を起こさないようにするのは難しく、良い結果は期待できない。これに対し、本発明で得られる疎水結合性吸着ポリマーでコーティングされた細胞培養基質は、その表面にリンカーを介して細胞を播種する方法で、細胞を効率よく、しかも再現性良く固相化でき成績を著しく向上させることができる。例えば、市販の「培養細胞伸展装置」は、周期的に一軸方向に伸展刺激を与え、生体内に近い状態での強制的伸展刺激による細胞の形態変化を観察することができる。本装置に使用されるシリコンウェル（シリコンゴム製の培養皿）として、本発明のポリマーでコーティングされたシリコンウェルを使用した場合、伸展刺激の際に培養基質から細胞が剥離すること無く、細胞観察を行うことができる。

#### 【0038】

また、本発明は、屈曲・変形する材質に、細胞接着活性を有する物質を固相化することができる。例えば、現在では、折り曲げられるプラスチックにプリント配線や IC 回路が作製されている。このような材質に、プリント技術で、MMA C 等をコーティングしリンカーとして細胞接着ペプチドを固相化するか、あるいは予め反応性ポリマーと結合させたペプチドをプラスチックに直接固相化し、細胞を回路図のように配置する際に有用である。

#### 【0039】

さらに、本発明は、細胞が接着し難い材質（強度の疎水性や滑らかな表面を有するポリマー、無機材、金属等）に、細胞接着活性を有する物質を固相化することができる。例えば、合成ポリマーで作製した人工血管や人工心肺のホロファイバーは、血小板が吸着して血栓を形成しないように、極力疎水性で凹凸が少なく滑らかな素材で作製されている。この様な素材でも血栓はでき、それが脳や肺の微小血管に詰まる医療問題となっている。ヘパリンをコートして血栓形成を少しでも防止する試みがなされているが、それでも血栓の形成はなかなか止まない。この対策には、合成ポリマーをMMA Cやスチレン骨格の反応性ポリマー等でコーティングし、ヘパリンを固相化する方法や、血管内皮細胞でプラスチック表面を覆う方法が有効であると考えられている。因みに血管内皮細胞には、血栓形成を防止する働きが有る。その際に、ヘパリンの固相化や、細胞接着活性を有するリンカーを固相化し、血管内皮細胞を播種し、プラスチック表面を覆う目的に活用できる。

#### 【0040】

##### 【実施例】

以下、実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、この発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

##### 実施例1（シリコンウエルのコーティング）

20mm×20mm×10mmの溝を有するシリコンウエルに、50 $\mu$ g/mlのMMA C（ISP, International Specialty Products, USA）のエタノール溶液0.5mlを注ぎ、余分な溶液は吸い取り、その後風乾することにより、MMA Cでコーティングされたシリコンウエルを得た。

なお、シリコンウエルがMMA Cでコーティングされているか否かは、例えば、以下の実施例に示すように、シリコンウエルをMMA Cでコーティングした後、リンカーを固相化し、次いで細胞を播種、培養することにより確認することが出来る。

#### 【0041】

##### 実施例2（T2細胞の静置培養）

実施例1の方法で得たコーティングしたシリコンウエルに、0.1Mトリエタ



ノールアミン緩衝液、pH 8.8に溶かした $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のフィブロネクチン (FN)、ラミニン-1 (LN) の細胞接着蛋白質溶液、あるいは $0.25\text{mg}/\text{ml}$ のFIB-1、AG-73の細胞接着ペプチド溶液を各々注ぎ、 $37^{\circ}\text{C}$ で数時間以上反応させ、これらの細胞接着活性を有する蛋白質あるいはペプチド類を固相化した。その後、単位面積当たり $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ の肺胞II型上皮細胞 (T2細胞) 懸濁液を注いで、 $\text{CO}_2$  培養装置内で培養を開始した。

いずれのリンカーを固相化した場合も、T2細胞は良好に増殖し、細胞密度が増大した (図1)。このことは、何れのMMACコーティングによるリンカーの固相化反応も、細胞毒性を有しないと理解される。

なお、図中の1d、2dおよび3dは、それぞれ培養日数を意味する。

#### 【0042】

##### 実施例3 (T2細胞の伸展培養1)

実施例2の方法とほぼ同様にして調製した、リンカーを固相化したシリコンウェルに単位面積当たり $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ のT2細胞を播種し、1日間静置培養した。播種した細胞が培養面全体を confluent に伸展していることを確認した後、培養細胞伸展装置 ((株) スカラテック社製) を用い、25%伸展率、毎分15回の頻度で水平方向に強制的に細胞伸展を開始し、更に1日間培養を継続した。培養終了後、細胞接着の状態を位相差顕微鏡で撮影した (図2の上段4列)。

固相化FNやLNの場合 (FN, 1dC-1dSおよびLN, 1dC-1dS) は、それほど顕著ではないが、固相化したFIB-1やAG-73細胞接着ペプチド上で、強制伸展させながら細胞培養した場合 (FIB-1, 1dC-1dS) 及びAG73, 1dC-1dS) は、T2細胞が強制伸展方向と垂直方向 (図2の写真の縦方向) に自律的に細長く伸展して、強制伸展の影響を極力減衰させようと配向し直したことが明瞭に観察される。これに比べて、固相化FNやLNの場合はそれほど明瞭では無いのは、固相化した細胞接着蛋白質と細胞との接着が強制伸展力に対抗できる程度には十分強いため、配向し直す必要が無かったためと推測される。

#### 【0043】

##### 実施例4 (T2細胞の伸展培養2)

実施例 2 の方法とほぼ同様にして調製した、リンカーを固相化したシリコンウェルに単位面積当たり  $5 \times 10^4 / \text{cm}^2$  の T2 細胞を播種し、3 日間静置培養した。T2 細胞は、図 1 の 3 d と同様に生育した（結果は、重複するので示さず）。次に、図 1 と同じ強制伸展刺激を与え、更に 1 日間培養を継続した。培養終了後、細胞接着の状態を位相差顕微鏡で撮影した（図 2 の中段 4 列）（FN, 3 d C-1 d S、LN, 3 d C-1 d S、FIB-1, 3 d C-1 d S、および AG 73, 3 d C-1 d S）。

3 日間の静置培養中に T2 細胞は、固相化したリンカーに強固に結合でき、伸展・増殖したと考えられる。そのため、強制的に細胞伸展負荷を 1 日間課した後でも、T2 細胞は図 2 上段ほど明瞭に配向し直すことはなかった。

#### 【0044】

#### 実施例 5 （T2 細胞の伸展培養 3）

実施例 4 の伸展培養とほぼ同様にして、強制的な伸展培養を 3 日間行った。培養終了後、細胞接着の状態を位相差顕微鏡で撮影した（図 2 の下段 4 列）（FN, 3 d C-3 d S、LN, 3 d C-3 d S、FIB-1, 3 d C-3 d S、及び AG 73, 3 d C-3 d S）。

3 日間の強制伸展刺激によって、T2 細胞の形質は、固相化したリンカーに依存して変化している。特に、生体内では T2 細胞の直下に存在する基底膜構造体の必須成分である LN、およびその接着ペプチドである AG-73 上に細胞を播種した場合には、立方体的な II 型上皮細胞から扁平な I 型上皮細胞様に変化している。生体内では、呼吸運動に伴い肺胞内で最も強制的な細胞伸展を繰り返し受けているのは、厚みのある II 型上皮細胞ではなく、扁平な I 型上皮細胞である。3 日間の強制的細胞伸展は、生体内と同様に II 型上皮細胞を I 型上皮細胞に分化させたことを示唆している。FN は、本来細胞に増殖や移動の刺激を与える細胞外基質である。固相化した FN やその細胞接着ペプチドである FIB-1 上では、LN や AG 73 程 I 型上皮細胞様にならなかったのは、FN の持つこの性質のためかもしれない。

#### 【0045】

なお、実施例 3～5 で行った強制的な細胞伸展培養（伸展率 25%）は、前記

した培養細胞伸展装置で通常行われている伸展率10%に比べ、かなりの負荷を細胞に与えている。この為、本装置に通常このような負荷を掛けると細胞は剥離すると言われているが、本発明のコーティングしたシリコンウェルを使用することにより、剥離することなく、良好に増殖した。

#### 【0046】

#### 【発明の効果】

本発明によると、疎水結合性吸着ポリマーでコーティングしたシリコンウェルを使用することにより、細胞培養において、例えば、培養細胞伸展装置で通常行われている以上の過度の負荷を細胞に与えても、細胞は剥離することなく、良好に増殖することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【図1】

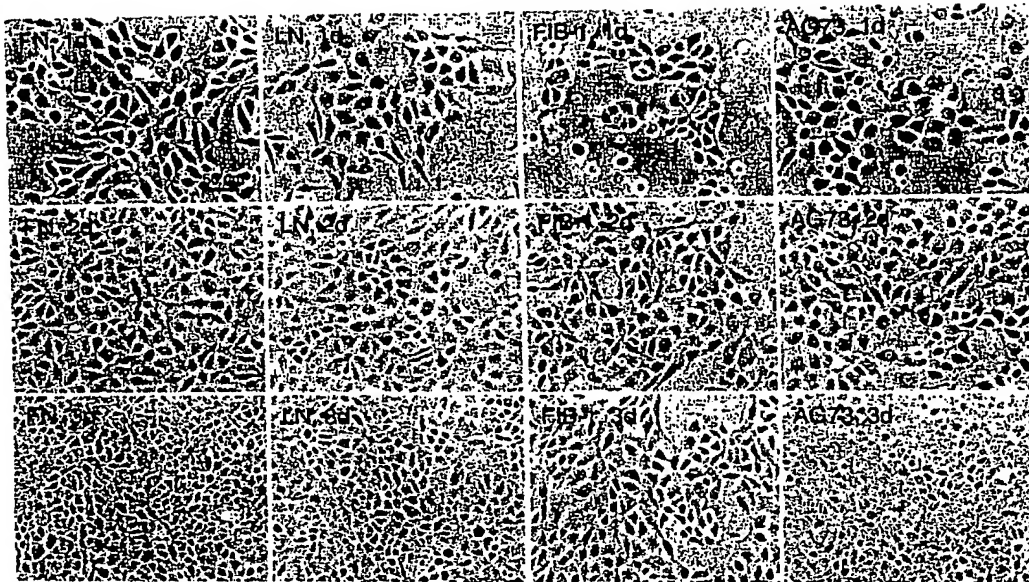
肺胞上皮細胞（T2細胞）をシリコンウェル上で静置培養した結果形成された肺胞上皮組織の位相差顕微鏡写真を示す図である。

#### 【図2】

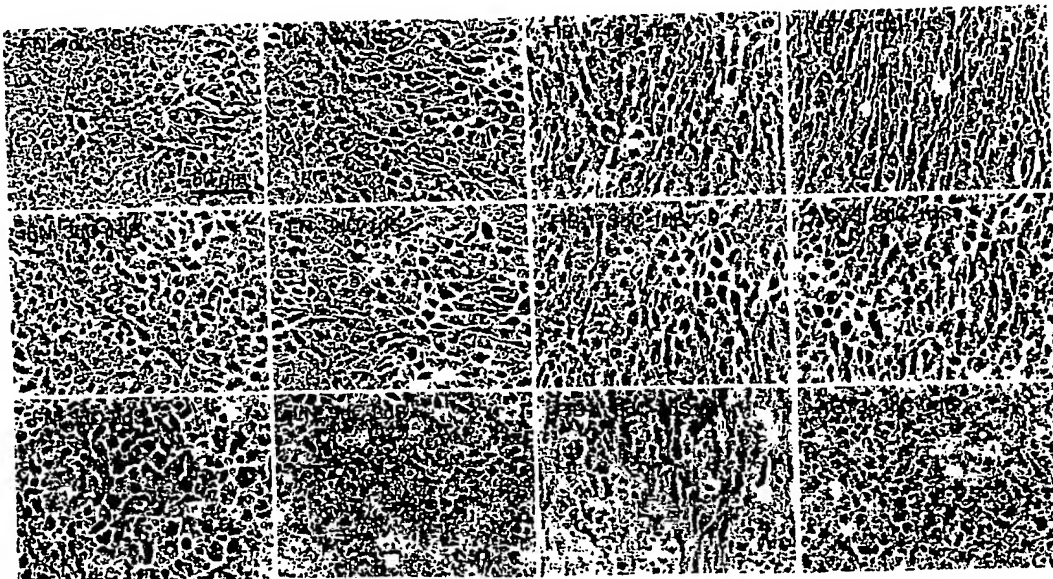
シリコンウェル上で培養した肺胞上皮細胞（T2細胞）を伸展培養した結果形成された肺胞上皮組織の位相差顕微鏡写真を示す図である。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 培養皿等の細胞培養基質に効率よく吸着し、細胞接着の再現性に優れた、細胞培養基質表面に疎水結合性吸着ポリマーでコーティングされている細胞培養基質および該細胞培養基質にリンカーを介し、細胞を播種し、培養することにより調製された人工組織の製造方法を提供すること。

【解決手段】 培養細胞が基質に接着することを誘導するために、細胞培養に用いる親水性処理をしたプラスチック製培養皿に代わって、細胞接着のリガンド（リセプターの結合相手となる細胞外基質分子）で培養皿の疎水性表面をコーティングする。

【書類名】 出願人名義変更届  
【整理番号】 2003P1549  
【提出日】 平成15年 6月12日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【事件の表示】  
    【出願番号】 特願2003- 81148  
【承継人】  
    【持分】 010/100  
    【識別番号】 501273886  
    【氏名又は名称】 独立行政法人国立環境研究所  
    【代表者】 合志 陽一  
【承継人代理人】  
    【識別番号】 100107984  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 廣田 雅紀  
【プルーフの要否】 要

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願2003-081148
受付番号	50300983646
書類名	出願人名義変更届
担当官	笹川 友子 9482
作成日	平成15年 7月22日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

## 【承継人】

## 【識別番号】

501273886

## 【住所又は居所】

茨城県つくば市小野川16-2

## 【氏名又は名称】

独立行政法人国立環境研究所

## 【承継人代理人】

申請人

## 【識別番号】

100107984

## 【住所又は居所】

東京都港区赤坂二丁目8番5号 若林ビル3階

廣田特許事務所

## 【氏名又は名称】

廣田 雅紀

特願 2003-081148

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[503108883]

1. 変更年月日  
[変更理由]  
住 所  
氏 名

2003年 3月24日  
新規登録  
茨城県つくば市竹園3-108-404  
持立 克身



特願 2003-081148

出願人履歴情報

識別番号

[501273886]

1. 変更年月日

2001年 7月10日

[変更理由]

新規登録

住所

茨城県つくば市小野川16-2

氏名

独立行政法人国立環境研究所